



**INMUNOEXPRESIÓN DEL EJE CCR5/CCL5 EN CARCINOMA  
ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PACIENTES CON Y SIN  
METÁSTASIS LINFONODAL CERVICAL**

**Trabajo de Investigación**

**Requisito para optar al**

**Título de Especialista en Patología Oral y Maxilofacial**

**Residente: Bastian Alejandro Godínez Pacheco**

**Docente Guía: Wilfredo Alejandro González Arriagada**

**Valparaíso – Chile**

**2022**



## **Dedicatoria**

A mis padres, mis hermanos, mis abuelos y a quien se sienta parte de mi proceso formativo profesional.

## **Agradecimientos**

Al cuerpo docente de la Universidad de Valparaíso.

Al Dr. Wilfredo González por permitirme ser parte de su proyecto.

Al Hospital Carlos Van Buren y al Dr. René Martínez por posibilitarnos trabajar con las muestras e información de sus pacientes.

A la Universidad de Concepción por apoyarme en mi formación de especialidad.

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Pregunta de investigación, Hipótesis y Objetivos .....	12
3. Materiales y método.....	13
4. Resultados .....	15
5. Discusión .....	22
6. Conclusiones.....	26
7. Resumen.....	27
8. Bibliografía.....	28

## **1. Introducción**

Los cánceres de cabeza y cuello (CCC) alcanzaron aproximadamente 890.000 nuevos casos y 450.000 muertes a nivel mundial en 2018, representando el séptimo cáncer más frecuente en todo el mundo (1). En Chile, la incidencia estimada para el 2020 reportada por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (International Agency for Research on Cancer (IARC)) es de 818 casos nuevos considerando cáncer de: labio y cavidad oral (n= 295), laringe (n= 217), orofaringe (n= 119), glándulas salivales (n= 102), hipofaringe (n= 63) y nasofaringe (n= 22) (2).

### **1.1. Carcinoma oral de células escamosas**

El carcinoma de células escamosas es el subtipo histológico más común de los CCC (1,3). A pesar de los avances en la prevención, el diagnóstico y los tratamientos multimodales, los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello recurrentes y/o metastásicos se desarrollan en aproximadamente el 50% de los pacientes ante la presencia de un tumor primario localmente avanzado (1,4). Los pacientes con carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello recurrente y/o metastásico tienen un pronóstico muy pobre, con una mediana de supervivencia global (SG) inferior a un año (4). La metástasis linfonodal es un predictor del comportamiento del tumor y es determinante para el pronóstico y el manejo clínico. De hecho, la metástasis en los ganglios linfáticos es uno de los peores indicadores de pronóstico adverso para los pacientes con carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (5).

Entre los casos notificados de CCC, el carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia más frecuente reportada, y se está convirtiendo en un problema creciente en todo el mundo (1,6). Las estimaciones globales indican que el cáncer oral es uno de los más comunes en el mundo, estando entre los diez primeros cánceres en varios países y representando unos 354.864 nuevos casos. La tasa estimada de cáncer de cavidad oral fue de 5,8 en hombres y 2,3 en mujeres por cada 100.000 en 2015 (2,7). También hay diferencias regionales sustanciales cuando se examina por sexo y grupos de edad. De la incidencia mundial estimada, dos tercios de los cánceres orales se producen en países

de bajos ingresos, y la mitad de esos casos se encuentran en el sur de Asia (Imagen 1) (8). Sólo en la India se registran aproximadamente 100.000 casos incidentes cada año. Existen considerables variaciones geográficas en la incidencia de este cáncer, y las tasas varían en más de 20 veces en todo el mundo. Se estima que Papúa Nueva Guinea tiene la mayor tasa de incidencia de cáncer oral del mundo. Otras regiones con altas tasas de incidencia de cáncer oral (excluyendo el de labio) son el sur de Asia (por ejemplo, Maldivas, Sri Lanka, India y Pakistán), el este de Asia (por ejemplo, Taiwán), partes de Europa occidental (por ejemplo, el noroeste de Francia y Portugal) y Europa oriental (por ejemplo, Hungría, Eslovaquia y Eslovenia), y partes de América Latina y el Caribe (por ejemplo, Brasil, Uruguay y Puerto Rico). Los cinco países con las tasas más altas del mundo (Papúa Nueva Guinea, Taiwán, Maldivas, Sri Lanka y Pakistán, por orden de frecuencia) eran predominantemente de las regiones de Oceanía y Asia oriental y meridional (7,8). Las tasas ajustadas por edad para las poblaciones masculinas de los "países de alto riesgo" en el mundo se muestran en la imagen 2.

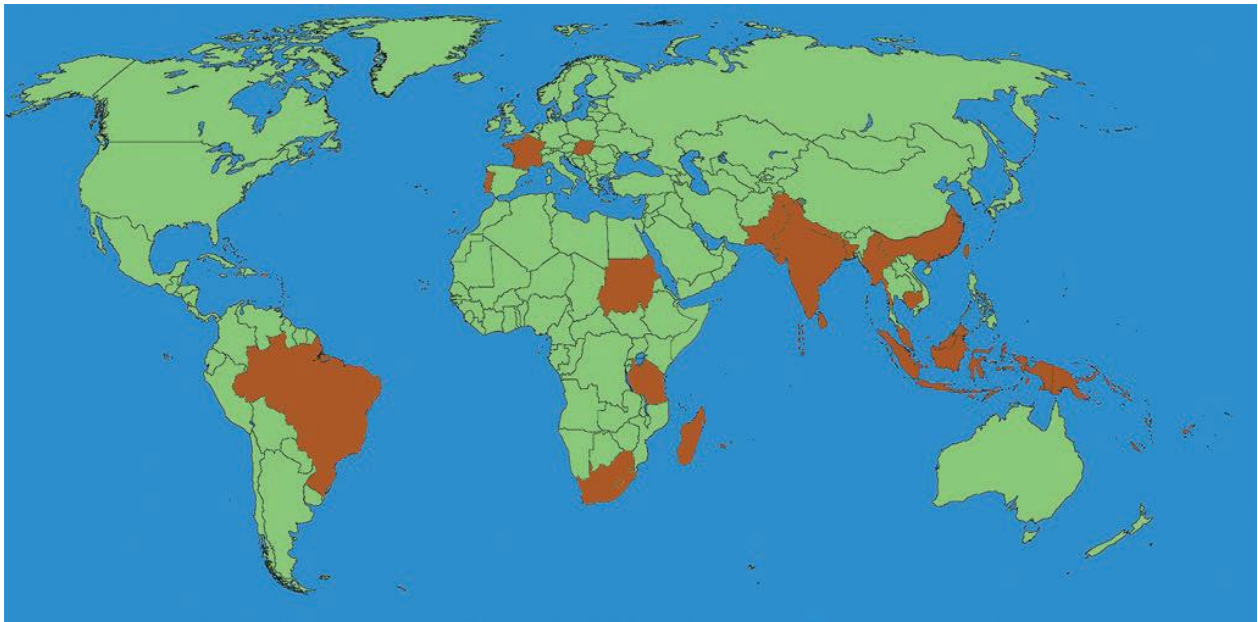


Imagen 1: Mapa mostrando países con alta incidencia de cáncer oral (Fuente Globocan, 2015 (2,7). Gráfico de Textbook of Oral Cancer, Saman Warnakulasuriya. 2020 (8)

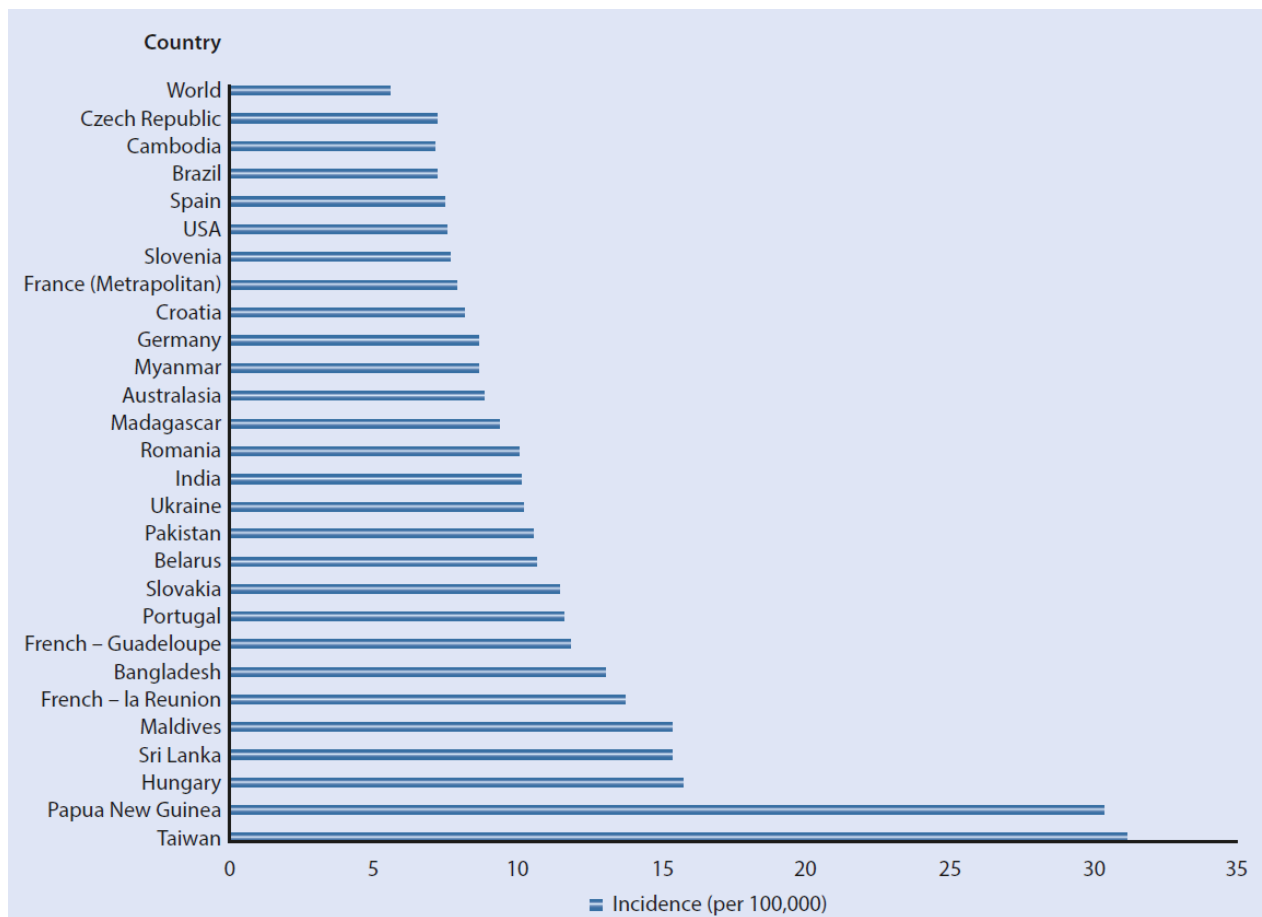


Imagen 2: Tasas de incidencia estandarizadas por edad de cáncer de labio y oral en hombres en determinados países de alto riesgo. (Fuente Globocan, 2015 (2,7). Gráfico de Textbook of Oral Cancer, Saman Warnakulasuriya. 2020 (8))

El cáncer de cavidad oral comprende anatómicamente: cara interna de labio, dorso lingual, encías, paladar duro y blando, mucosa bucal, piso de boca y trígono retromolar, excluyendo la base de la lengua (3,9) (Imagen 3). Conway y cols. propusieron una forma de "consenso" para describir el COCE y los cánceres orofaríngeos de forma diferenciada, que está acorde con la codificación de la Clasificación Internacional de Enfermedades Oncológicas (CIE-O) (9,10). Previo a esta diferenciación anatómica era fácil traslapar y confundir el COCE con el carcinoma escamoso orofaríngeo, llevando a confusión tanto a clínicos como investigadores. El cáncer de cavidad oral ha manifestado un aumento en la incidencia al comparar países en vías de desarrollo con países desarrollados (3), sin embargo, asociado con los cambios en el estilo de vida, se ha notado un cambio en este

escenario, teniendo un aumento de casos notificados de COCE también en países desarrollados (3).

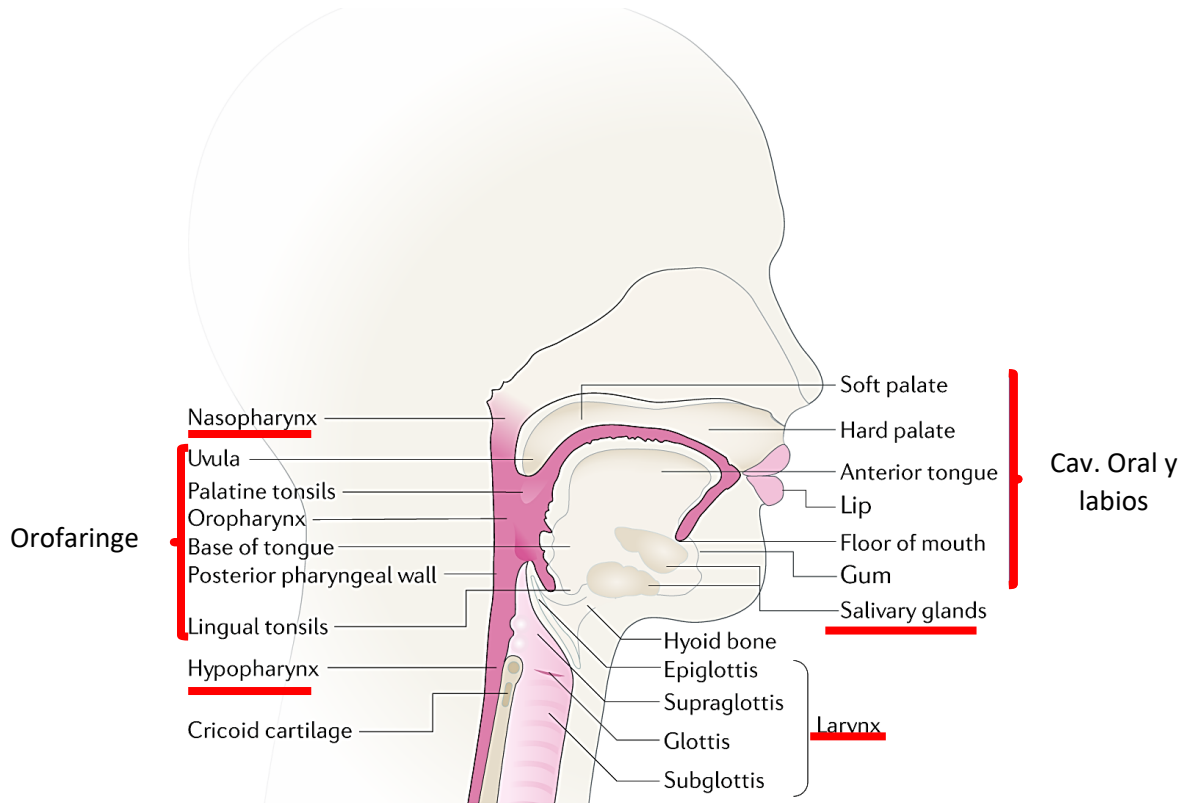


Imagen 3: Diferencia anatómica de cavidad oral y orofaringe. Esquema modificado de Johnson DE, et al. (8).

El sistema de estadificación actual para el COCE tiene limitaciones para identificar carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello de alto riesgo, ya que se ha encontrado una gran variabilidad en los resultados clínicos en pacientes con estadios clínicos similares. Para identificar a los pacientes de alto riesgo de recurrencia y pobre pronóstico de supervivencia, se necesitan urgentemente nuevos biomarcadores para establecer una mejor predictibilidad y guiar un tratamiento personalizado (11,12).

Los estudios epidemiológicos han evidenciado que la susceptibilidad al cáncer oral de un individuo está mediada tanto por carcinógenos ambientales como el alcohol, el consumo de tabaco y la masticación de nuez de betel, como también por factores genéticos (1,3,9). Se piensa que la inflamación es un factor de riesgo en el inicio y la progresión de los

tumores (13). La respuesta inflamatoria y el tráfico de células inmunitarias pueden ser inducidos por varias citoquinas, quimiocinas y sus receptores. Por lo tanto, en los focos inflamatorios crónicos se forma un microambiente adecuado para el crecimiento neoplásico. La calidad y cantidad de la infiltración de células inmunitarias podría afectar a la proliferación, supervivencia, propagación y respuesta angiogénica de las células malignas (11,14,15).

La asociación entre la inflamación crónica y el cáncer se reporta desde hace muchos años. Kuper y cols., el 2000, reportan que el 15% de todos los cánceres se atribuyen a la inflamación (16), con una asociación bien reconocida en los cánceres de pulmón, páncreas, esófago, vejiga, gástrico, cervical, colorrectal y de próstata. Las citoquinas proinflamatorias presentes en el microambiente tumoral (MAT) pueden tener un doble efecto, estimular la inflamación para disminuir la progresión del tumor o pueden hacerlo favoreciendo la carcinogénesis, crecimiento del tumor y metástasis. Las citoquinas son producidas por las células del huésped en respuesta a factores secretados por las células tumorales o por el propio tumor (15). Se ha observado que los cambios en la expresión de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento pueden tener implicancias en la transformación maligna de muchos cánceres, incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

## **1.2. Quimioquinas**

Las quimioquinas son un grupo particular de citoquinas que se describieron originalmente como agentes quimiotácticos para los leucocitos (12) para viajar hacia el linfonodo para su maduración o hacia el sitio de inflamación. Ellas pueden unirse a receptores acoplados a proteínas G de 7 dominios de membrana que se expresan predominantemente en los leucocitos. Las quimiocinas se clasifican en 4 subgrupos diferentes (CXC, CC, CX3C, o C) dependiendo de su secuencia de aminoácidos (17,18). Las quimioquinas están estrechamente relacionadas con la inflamación, la inmunidad, el desarrollo de tumores y su pronóstico. Dentro del grupo de quimioquinas encontramos la quimioquina C-C ligando 5 (CCL5), que junto con el receptor de la quimioquina C-C 5 (CCR5) forman parte del eje

CCL5/CCR5 el cual tiene un importante rol en la progresión tumoral. Los genes de CCL5 y CCR5 han sido localizados en el cromosoma 17q11.2-q12 y 3q21, respectivamente. CCL5 conocida como Rantes (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) forma parte de la familia de quimioquinas C-C motif la cual incluye a CCL3 (macrophage inflammatory protein 1-alpha, MIP-1 $\alpha$ ) y CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) (10,19). CCL5 se une con alta afinidad a CCR-5, pero también se une a CCR1, CCR3, CCR4, CD44 y GPR75. Esta es expresada por linfocitos T, macrófagos, plaquetas, fibroblastos sinoviales, epitelio tubular y células tumorales (20).

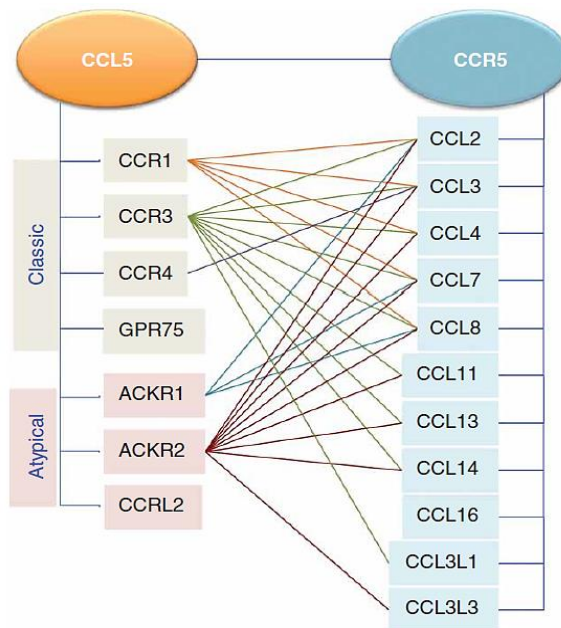


Imagen 1: Complejidad de las interacciones de CCL5 y CCR5. La quimiocina CCL5 se une a diferentes receptores, incluido el CCR5. El CCR5 también puede unirse a muchos ligandos diferentes. Existe una interacción redundante entre los receptores y ligandos representados. CCL5: Ligando de quimioquina (motif C-C) 5; CCR5: Receptor de quimioquina 5. Esquema de Chuang J. et al. (17).

CCR5 es un receptor siete-transmembrana acoplado a proteína G, el cual participa en diversas cascadas de señalización en respuesta a sus ligandos (20). Es un receptor promiscuo como muestra la imagen 1, el cual se une con alta afinidad a CCL5, CCL3, CCL4 y CCL8. El acople de CCR5 activa la proteína G y desencadena señales en

cascada de transducción como la proteína quinasa B (PKB, conocida también como Akt), y la vía NF- $\kappa$ B (Factor nuclear kappa-reforzador de cadena ligera de células B activadas), la reorganización del citoesquelético celular y la quimiotaxis. Varias células expresan CCR5 como linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos y microglías. Este receptor desempeña un papel fundamental en la respuesta inflamatoria dirigiendo las células a los sitios de inflamación. CCR5 es el mayor receptor para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y su interacción con CD34, un marcador de células madre hematopoyéticas, ha demostrado que promueve el desarrollo del cáncer (21).

### **1.3. Eje CCL5/CCR5 en cáncer**

El eje CCL5/CCR5 puede influir en la progresión tumoral mediante múltiples mecanismos, tales como aumento del crecimiento tumoral, remodelación de la matriz extracelular, aumento en migración de células tumorales (invasión y metástasis), proliferación de células madre cancerígenas de soporte, aumento de resistencia a fármacos, disminución de toxicidad a agentes que dañen el ADN, desregulación energética de las células, promoción de la angiogénesis, reclutamiento de células estromales e inmunes, e inducción de la polarización inmunosupresora de macrófagos (20) (Imagen 2).

En la transición epitelio-mesénquima (TEM), altos niveles de CCL5 o CCR5 pueden ser resultado de la sensibilización de células normales, o del reclutamiento y acumulación de células CCR5+. Una sobreexpresión de CCL5 y/o CCR5 se ha visto en diversos cánceres incluyendo leucemia, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer pancreático, adenocarcinoma gástrico, cáncer esofágico, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, cáncer de cabeza y cuello incluyendo el COCE (10,13,18,20,22–25).

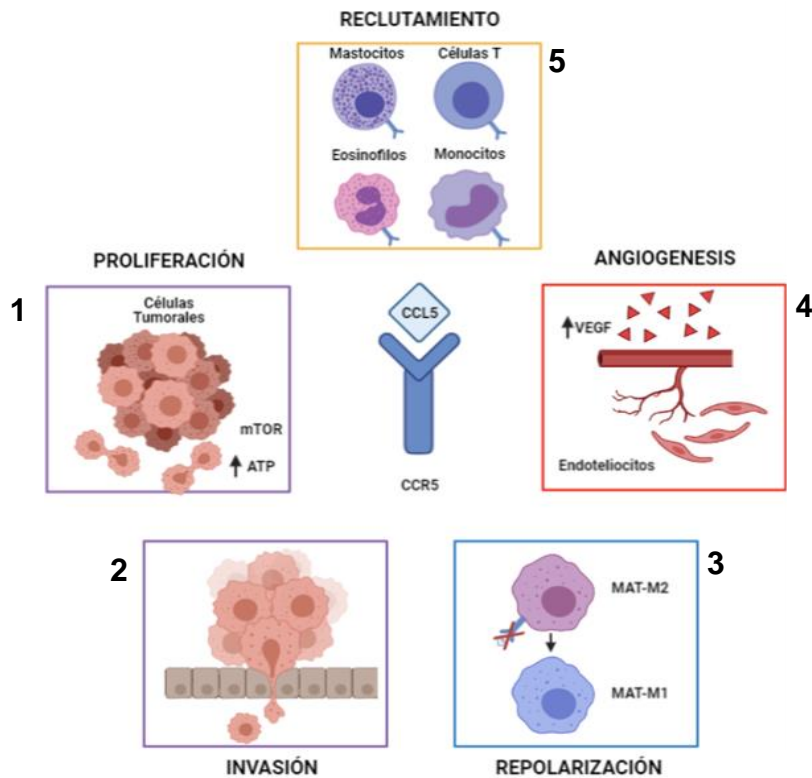


Imagen 2: Efectos de las interacciones del ligando de quimiocina C-C 5 (CCL5) y del receptor de quimiocina C-C tipo 5 (CCR5) en el cáncer. El CCL5 secretado por las células tumorales o por los fibroblastos asociados al cáncer (CAF), recluta monocitos, células T, eosinófilos y mastocitos en el microambiente tumoral (MAT). El CCL5 induce la proliferación de las células tumorales a través de la vía del receptor de rapamicina de los mamíferos (mTOR) y aumenta la producción de ATP, potencia la migración/invasión de las células tumorales a través de la activación de la integrina  $\alpha\beta3$  y la regulación de las metaloproteinasas de matriz-2/9 (MMP-2/9), y promueve la angiogénesis al inducir la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); la activación del eje CCR5/CCL5 reprograma los macrófagos inmunosupresores M2 asociados al tumor (TAM) para convertirlos en M1-TAM antitumorales. Traducción de imagen de Aldinucci, D. et al (17).

El CCR5 podría ser expresado principalmente en las últimas etapas de la progresión del cáncer. Ciertamente todos estos receptores son importantes para captar quimiocinas para conducir las células neoplásicas a los ganglios linfáticos, pero el CCR5 podría estar asociado con una transformación más agresiva de la célula neoplásica, lo que llevaría a recidiva local y peor tasa de supervivencia.

Dentro del proceso de carcinogénesis, la coevolución del tumor y el MAT, parecen ser válidos también para los sitios secundarios y metastásicos. La supervivencia y la

proliferación de las células tumorales como focos metastásicos exitosos requieren un MAT receptivo en el lugar de destino. El término nicho premetastásico (NPM) se ha acuñado para describir el proceso de creación de un MAT que favorezca la adhesión y la invasión de las células tumorales en el posible órgano/sitio metastásico (26), ofreciendo una oportunidad para que las células tumorales primarias se adapten y sobrevivan eficazmente incluso en microambientes hostiles (27). El concepto de NPM se ha estudiado principalmente en el cáncer de mama y melanoma como tumores primarios, y en pulmones como sitio metastásico (Psaila y Lyden, 2009; Peinado y cols., 2011; Sleeman, 2012). El NPM en cáncer oral apenas se ha investigado hasta ahora, y sólo unos pocos estudios se han referido a la linfangiogénesis dentro de los linfonodos cervicales como indicador de NPM (26).

La principal técnica laboratorial complementaria para detectar la presencia de marcadores en los tejidos es la inmunohistoquímica y diversos autores han reportado la expresión de algunos de estos marcadores en tejidos embebidos en parafina.

#### **1.4. Inmunohistoquímica**

Una de las técnicas útiles para poder detectar específicamente la expresión de los receptores mencionados anteriormente, es la inmunohistoquímica (IHQ) (28). La IHQ es un procedimiento histopatológico basado en la utilización de anticuerpos, que mediante reacciones antígeno-anticuerpo, permiten identificar marcadores antigénicos en los tejidos embebidos en parafina, que luego se observan en el microscopio óptico. Esta técnica de laboratorio se basa en los principios básicos de la inmunología como la reacción antígeno-anticuerpo (Imagen 3 y 4). Tiene como objetivo detectar, amplificar y hacer visible un antígeno específico, que generalmente es una proteína (28,29). Una ventaja de la de la IHC sobre otros métodos de detección de proteínas es la capacidad de correlacionar la presencia de un antígeno con su localización específica en un tejido o una célula (28,29). Esto es muy importante para el estudio de la función celular en tejidos normales y patológicos. Desde su introducción, la IHQ se ha aplicado ampliamente

a múltiples áreas de la biología, incluyendo la función celular y la caracterización de lesiones.

Se pueden encontrar una variedad de métodos para IHQ, pero el objetivo final de cualquiera de ellos es detectar el antígeno con la menor tinción de fondo posible (máxima relación señal-ruido). Por regla general, con algunas excepciones, cuanto más compleja es la técnica, más sensible es. Existen numerosos kits de detección disponibles en el mercado (Imagen 5), como, por ejemplo: métodos directos e indirectos, de dos pasos, de inmunoenzimas basadas en polímeros, de múltiples pasos, de complejo Estreptavidina-Biotina, basado en tiramina, con antígenos de detección múltiple, con tinción de doble secuencia inmunoenzimática utilizando anticuerpos primarios de la misma o diferente especies. En este último método se encuentra el sistema EnVision™ FLEX, High pH (Dako Omnis), el cual detecta anticuerpos primarios de ratón y conejo. El procedimiento para este sistema consiste en la desparafinización de cortes de tejido, la recuperación antigénica del epítipo inducida por calor, la tinción inmunohistoquímica y la contratinción de los cortes de tejidos en parafina y fijados en formol.

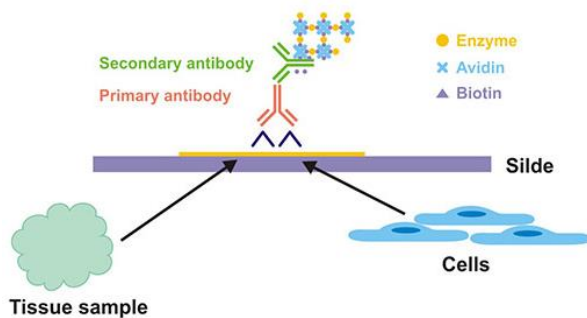


Imagen 3: Representación básica de la inmunohistoquímica

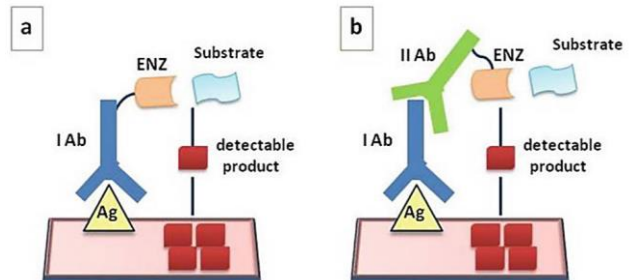


Imagen 4: Métodos de inmunohistoquímica: Directa (a) e Indirecta (b). Ag: Antígeno; I Ab: Anticuerpo primario; II Ab: Anticuerpo secundario; ENZ: Enzima

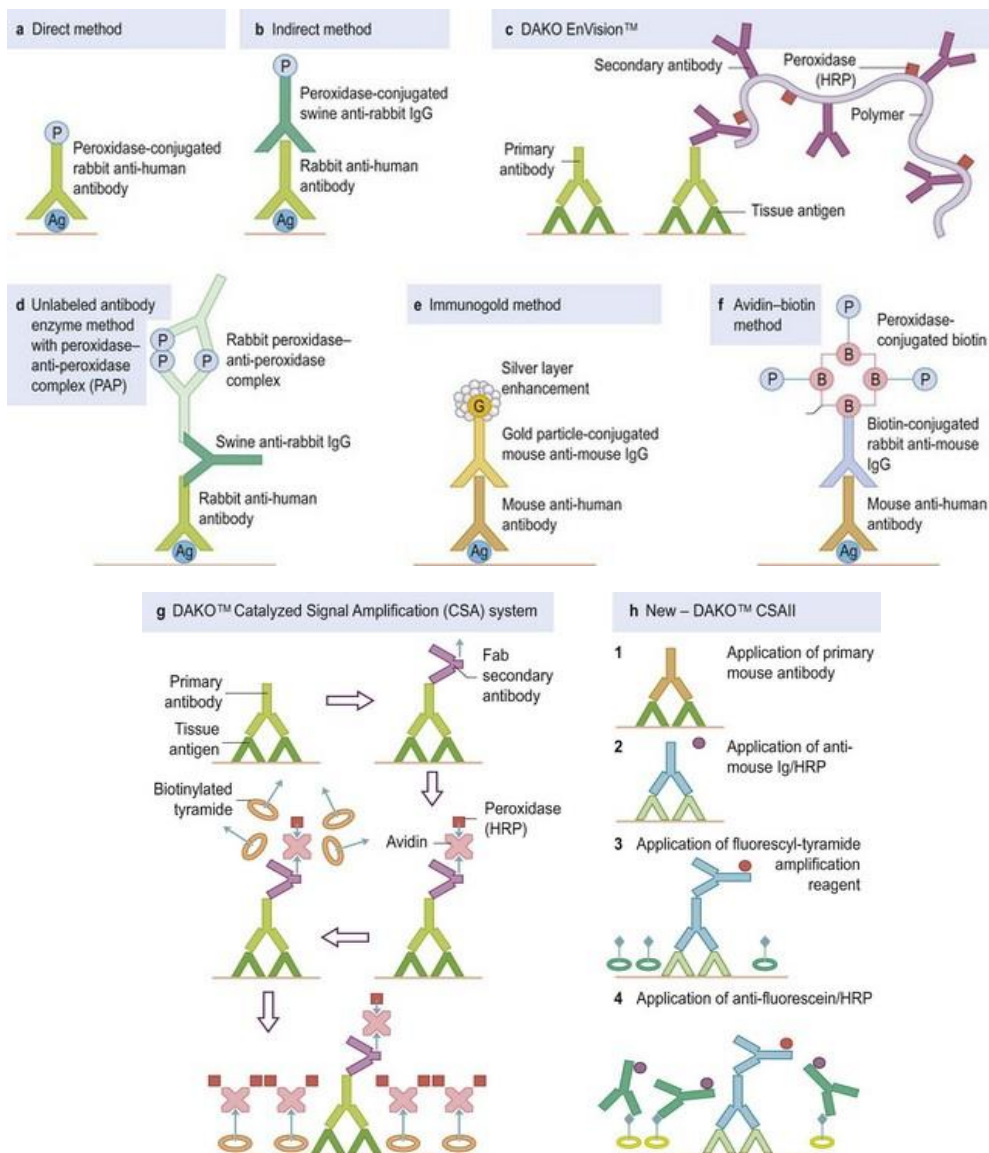


Imagen 5: Esquemas representativos de los diferentes kits para aplicar técnica de inmunohistoquímica. Imágenes representadas por la marca DAKO.

El sistema DAKO EnVision™, es uno de los más utilizados actualmente, el cual, para proceder a la tinción, los cortes de tejidos embebidos en parafina y fijados en formol se someten a desparafinación y rehidratación seguidas de la recuperación del epítipo inducida por calor (HIER) mediante un método de recuperación diana del anticuerpo primario. La peroxidasa endógena se debe bloquear por un procedimiento de lavado eficaz y a la presencia de proteínas estabilizantes en los reactivos del sistema, no es

necesario llevar a cabo un bloqueo extra con el fin de reducir la tinción de fondo no específica. El reactivo Dako EnVision™ FLEX /HRP (DM842), que se incluye en el kit, se compone de un soporte principal de dextrano al que se han unido un gran número de moléculas de peroxidasa de rábano picante (HRP) y moléculas de anticuerpo secundario. Para la reacción de unión se ha utilizado una química única, que permite la unión de hasta 100 moléculas de HRP y hasta 20 moléculas de anticuerpo por soporte principal. El sistema de sustrato que se incluye en el kit está compuesto por dos componentes: EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM847), una solución de diaminobencidina (DAB) concentrada y EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM843), que contiene peróxido de hidrógeno. Antes de su uso, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen se debe diluir en EnVision™ FLEX Substrate Buffer. El sistema de sustrato produce un producto final marrón claro en el lugar del antígeno diana. El mezclado oportuno del cromógeno y el tampón se realiza automáticamente en el instrumento Dako Omnis. Se recomienda usar hematoxilina para la contratinción. El reactivo proporciona una tinción nuclear azul claro. Las secciones de tejido con tinción se deben preparar con un medio de montaje acuoso o basado en disolvente orgánico.

## **2. Pregunta de investigación, Hipótesis y Objetivos**

### **2.1 Pregunta de Investigación:**

Debido a que el eje CCR5/CCL5 juega un papel en el desarrollo de metástasis en diferentes tipos de cáncer y que el COCE tiene limitados estudios con dicho eje en metástasis linfonodal, la pregunta de investigación es ¿existe una expresión inmunohistoquímica diferente de los marcadores asociados al eje CCR5/CCL5 en COCE de pacientes con metástasis en ganglios cervicales comparado con pacientes sin metástasis?

Los resultados esperados busca adicionar conocimiento nuevo para un novel parámetro que ayude a la estadificación, mejorar el tratamiento y pronóstico de los pacientes con COCE.

## **2.2 Hipótesis:**

La expresión inmunohistoquímica de los marcadores asociados al eje CCR5/CCL5 en COCE es diferente entre pacientes con metástasis en ganglios cervicales comparado con pacientes sin metástasis.

## **2.3 Objetivo general:**

Comparar los niveles de inmunoexpresión de CCR5 y CCL5 en muestras de COCE de pacientes con y sin metástasis linfonodal.

## **2.4 Objetivo específicos:**

1. Determinar la inmunoexpresión CCR5 y CCL5 en muestras de COCE de pacientes con y sin metástasis linfonodal.
2. Asociar la inmunoexpresión de CCR5 y CCL5 en muestras de COCE con las variables sociodemográficas de los pacientes estudiados.
3. Asociar la inmunoexpresión del eje CCR5/CCL5 con la sobrevida de los pacientes con COCE.

## **3. Materiales y Métodos**

### **3.1 Pacientes y colección de muestras para inmunohistoquímica**

Muestras de tejido embebidas en parafina de 54 pacientes con COCE tratados en el Hospital Carlos van Buren, de los cuales 29 no presentaban metástasis linfonodal y 25 si la tenían presente. Los datos clinicopatológicos se obtuvieron de las historias clínicas de los pacientes. Las ubicaciones más frecuentes en cavidad oral fueron lengua y reborde alveolar. Los pacientes fueron tratados con la terapia estándar adecuada para el

respectivo estadio tumoral. Los tumores se clasificaron histológicamente según el sistema de clasificación de la OMS. Este estudio está enmarcado dentro del Fondecyt Regular n° 1190775 y aprobado por comité de ética para estudios en seres humanos de la Universidad de Valparaíso.

### **3.2 Anticuerpos para inmunohistoquímica**

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anti-CCR5 (PA5-19862, Invitrogen, Thermo Fischer)
- Anti-CCL5 (AHC1052, Invitrogen, Thermo Fischer).

### **3.3 Tinción inmunohistoquímica**

Secciones de 3 µm de espesor se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en etanol en concentración decreciente y agua destilada. La recuperación de antígenos fue con ácido cítrico, inducida por calor (EnVision™ Flex, High pH, EnVision™ Flex; Dako) durante 20 minutos a 95°C. Los portaobjetos se enfriaron durante 20 minutos, se lavaron y luego se incubaron con el bloqueo de enzimas endógenas (reactivo de bloqueo de peroxidasa EnVision FLEX) durante 5 minutos. Tras el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena las secciones se incubaron a 4°C durante overnight con los anticuerpos primarios (CCR5-1:400 y CCL5-1:400). Luego se lavó con agua corriente y se incubó con anticuerpo secundario (EnVision FLEX HRP) durante una hora a temperatura ambiente. La revelación se hizo con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) durante 10 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron con tampón de lavado y se contratiñeron con hematoxilina. Los controles negativos se realizaron omitiendo los anticuerpos primarios.

### **3.4 Evaluación de inmunohistoquímica**

Se aplicó un sistema de puntuación semicuantitativo de acuerdo con métodos previamente publicados para la evaluación de la intensidad de la tinción y el porcentaje de células teñidas (13). Los portaobjetos se puntuaron de forma independiente mediante observación en microscopio óptico (Leica DMLS2) sin conocimiento de los parámetros y resultados clínicos. El porcentaje de células positivas (PP) se definió como 0 (negativo), 1 (1%-25%), 2 (26%-50%), 3 (51%-75%) y 4 (76%-100%). La intensidad de la tinción (IT) se definió como 0 (negativa), 1 (débil), 2 (moderada) y 3 (tinción intensa). La puntuación inmunorreactiva final (PIR) se obtuvo multiplicando los valores de PP por IT. Para el análisis estadístico, las muestras se clasificaron como de baja expresión (puntuación final de 0 a 4 PIR) y de alta expresión (de 5 a 12 PIR).

### **3.5 Análisis estadístico**

Las asociaciones entre la expresión inmunohistoquímica del ligando, el receptor y los parámetros clinicopatológicos de los tumores se realizaron mediante la prueba de chi-cuadrado. Luego se construyeron curvas de supervivencia basadas en el método de Kaplan-Meier y se compararon con la prueba de log-rank. El nivel de significancia considerado fue del 5% ( $P \leq 0.05$ ).

## **4. Resultados**

Las características clinicopatológicas de los pacientes estudiados se encuentra resumida en la tabla I. Veintiocho individuos eran hombres (52%), mientras que el promedio de edad para toda la cohorte de pacientes fue de 63,4 años y la mediana de 64,5 años. Veintinueve pacientes eran fumadores (54%) y veintidós reportaron consumo de alcohol (40,7%). Treinta y dos pacientes presentaron tumores en lengua (59,3%), siendo este el sitio más afectado. Con respecto al peor patrón de invasión el tipo 4 fue el más frecuente con cuarenta y cinco casos (83,3%). Veintiséis presentaban invasión perineural (48,1%).

Tabla I. Datos clínico-patológicos de los pacientes estudiados.

<b>Parámetro</b>	<b>n (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Masculino	28 (52)
Femenino	26 (48)
<b>Edad</b>	
≤ 64,5 años	27 (50)
≥ 64,5 años	27 (50)
<b>Hábito de fumar tabaco</b>	
No	29 (53,7)
Si	25 (46,3)
<b>Hábito de fumar tabaco</b>	
No	32 (59,3)
Si	22 (40,7)
<b>Estadio clínico</b>	
I/II	20 (37)
III/IV	34 (63)
<b>Compromiso linfonodal cervical</b>	
No	29 (53,7)
Si	25 (43,6)
<b>WPOI</b>	
1	0 (0)
2	2 (4)
3	2 (4)
4	45 (83)
5	5 (9)
<b>PNI</b>	
No	28 (52)
Si	26 (48)
<b>Recurrencia</b>	
No	32 (59,3)
Si	22 (40,7)
<b>Estado del paciente</b>	
Muerto	26 (48)
Vivo	28 (52)
<b>Total de pacientes</b>	<b>54 (100)</b>

Tabla I. WPOI, peor patrón de invasión (worse patron of invasion); PNI, invasión perineural (perineural invasion).

Tanto CCR5 como CCL5 tuvieron una inmunopositividad citoplasmática en las células tumorales con variable intensidad y distribución (Figura 6). Adicionalmente los linfocitos peritumorales también mostraron diferente grado de inmunopositividad para CCR5 y CCL5. Un nivel alto de expresión, según IRS, para CCR5 fue observado en 59% de los pacientes y para CCL5 en un 54,7% de los tumores primarios estudiados.

La asociación entre los factores clinicopatológicos y la expresión de CCR5 y CCL5 es representada en la Tabla II. Para este grupo de pacientes, la alta inmunoposición de CCR5 fue correlacionada con la metástasis linfonodal cervical ( $p = 0,020$ ) y la invasión perineural ( $p = 0,011$ ). Por otra parte, altos niveles de expresión de CCL5 fueron asociados con un mayor estadio clínico ( $p = 0,025$ ), presentar invasión perineural ( $p = 0,037$ ) y con la muerte del paciente ( $p = 0,037$ ).

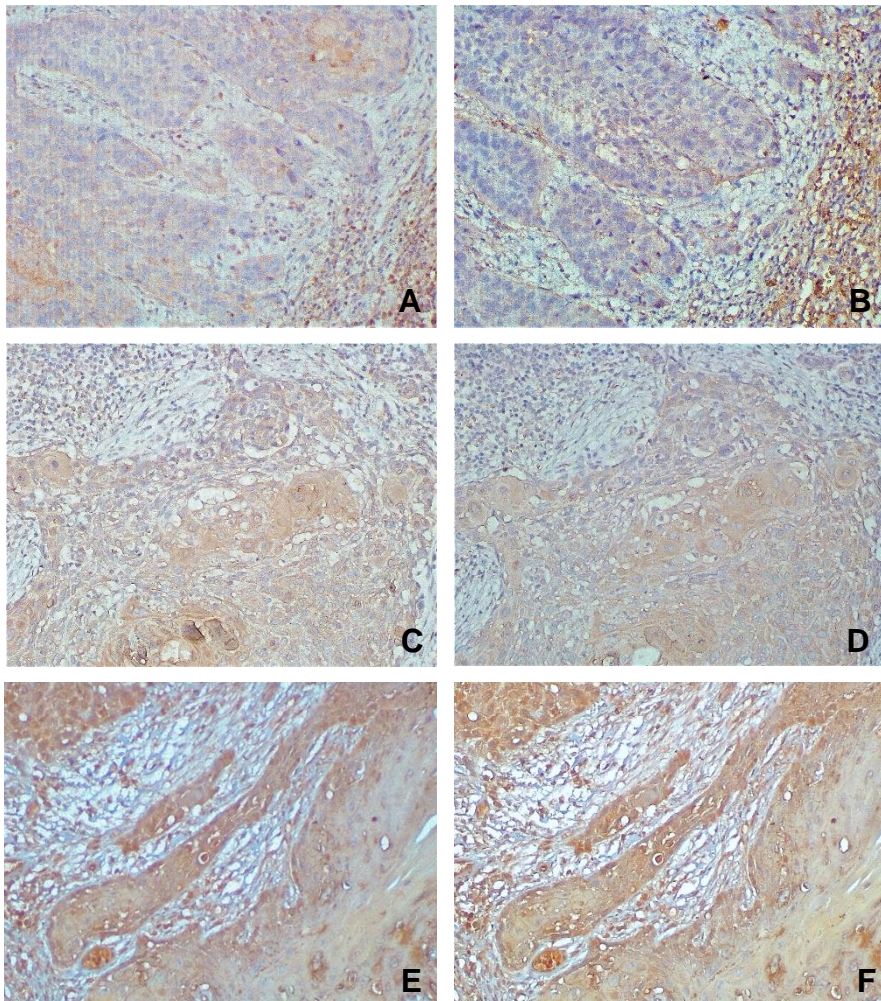


Imagen 6: Expresión inmunohistoquímica de CCR5 (A, C y E) y CCL5 (B, D y F) en carcinoma oral de células escamosas.

Tabla II. Asociación de parámetros demográficos y clínicos con expresión inmunohistoquímica de CCR5 y CCL5.

Parámetro	Expresión CCR5				Expresión CCL5			
	Baja expresión n (%)	Alta expresión n (%)	Total n	Valor p	Baja expresión n (%)	Alta expresión n (%)	Total n	Valor p
<b>Edad</b>								
≤ 64,5 años	10 (37)	17 (63)	27	0,580	13 (48,1)	14 (51,9)	27	0,669
≥ 64,5 años	12 (44,4)	15 (55,6)	27		11 (42,3)	15 (57,7)	26	
<b>Hábito de fumar tabaco</b>								
No	12 (41,4)	17 (58,6)	29	0,918	14 (50)	14 (50)	28	0,465
Si	10 (40)	15 (60)	25		10 (40)	15 (60)	25	
<b>Habito de beber alcohol</b>								
No	14 (43,8)	18 (56,3)	32	0,587	16 (51,6)	15 (48,4)	31	0,272
Si	8 (36,4)	14 (63,6)	22		8 (36,4)	14 (63,6)	22	
<b>Estadio clínico</b>								
I/II	11 (55)	9 (45)	20	0,102	13 (65)	7 (35)	20	<b>0,025</b>
III/IV	11 (32,4)	23 (67,6)	34		11 (33,3)	22 (66,7)	33	
<b>Compromiso linfonodal cervical</b>								
No	16 (55,2)	13 (44,8)	29	<b>0,020</b>	16 (57,1)	12 (42,9)	28	0,066
Si	6 (24)	19 (76)	25		8 (32)	17 (68)	25	
<b>WPOI</b>								
1	0 (0)	0 (0)	0	0,370	0 (0)	0 (0)	0	0,284
2	2 (100)	0 (0)	2		0 (0)	2 (100)	2	
3	1 (50)	1 (50)	2		2 (100)	0 (0)	2	
4	17 (37,8)	28 (62,2)	45		20 (45,5)	24 (54,5)	44	
5	2 (40)	3 (60)	5		2 (40)	3 (60)	5	
<b>PNI</b>								
No	16 (57,1)	12 (42,9)	28	<b>0,011</b>	16 (59,3)	11 (40,7)	27	<b>0,037</b>
Si	6 (23,1)	20 (26,9)	26		8 (30,8)	18 (69,2)	26	
<b>Recurrencia</b>								
No	15 (46,9)	17 (53,1)	32	0,269	16 (51,6)	15 (48,4)	31	0,272
Si	7 (31,8)	15 (62,8)	22		8 (36,4)	14 (63,6)	22	
<b>Estado del paciente</b>								
Muerto	9 (34,6)	17 (65,4)	26	0,377	8 (30,8)	18 (69,2)	26	<b>0,037</b>
Vivo	13 (46,4)	15 (53,6)	28		16 (59,3)	11 (40,7)	27	
<b>Total de pacientes</b>	22 (40,7)	32 (59,3)	54		24 (45,3)	29 (54,7)	53*	

WPOI, peor patrón de invasión (worse patron of invasion); PNI, invasión perineural (perineural invasion). Valores estadísticamente significativos destacados (test chi cuadrado). \*n = 53 por falta de una lámina de CCL5.

Para el análisis de supervivencia solo se pudieron incluir 51 pacientes por falta de datos de seguimiento en 3 pacientes. La supervivencia global (SG) de los pacientes con alta expresión de CCL5 era significativamente menor en comparación con la supervivencia de los pacientes con baja expresión, alcanzando 18 decesos de 20 pacientes con alta expresión del ligando ( $p = 0,05$ ) (imagen 7-A). Por otra parte, los pacientes con recurrencia presentaban una SG significativamente menor que los pacientes que no lo hicieron, donde 17 de 21 pacientes recurrentes de la enfermedad fallecieron ( $p = 0,01$ ) (imagen 7-B).

En la supervivencia específica (SE) encontramos que los pacientes que presentaban metástasis linfonodal cervical tenían una SE significativamente menor con respecto a los que no la presentaban, donde 12 de 22 que presentaban compromiso cervical fallecieron a los 5 años ( $p = 0,05$ ) (imagen 8-A). Así mismo, 15 de 21 casos con recurrencia fallecieron a los 5 años de padecer la enfermedad, mostrando una SE significativamente menor en comparación con los pacientes sin recurrencia ( $p = 0,01$ ) (imagen 8-B). No se encontraron asociaciones significativas de una alta expresión de CCR5 para la SG ni la SE, tampoco para la alta expresión de CCL5 y la SE de estos pacientes (imagen 9).



Imagen 7: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier de pacientes con carcinoma oral de células escamosas de 51 casos de este estudio. A) Curva de Kaplan-Meier mostrando una peor supervivencia global de pacientes con COCE que expresaron altos niveles de CCL5 (línea verde) comparado con los que presentaron bajos niveles de ligando (línea azul) ( $p = 0,05$ ). B) Curva de Kaplan-Meier mostrando una peor supervivencia global de pacientes con COCE que recurrieron de la enfermedad (línea verde) comparado con los pacientes sin recurrencia (línea azul) ( $p = 0,01$ ).

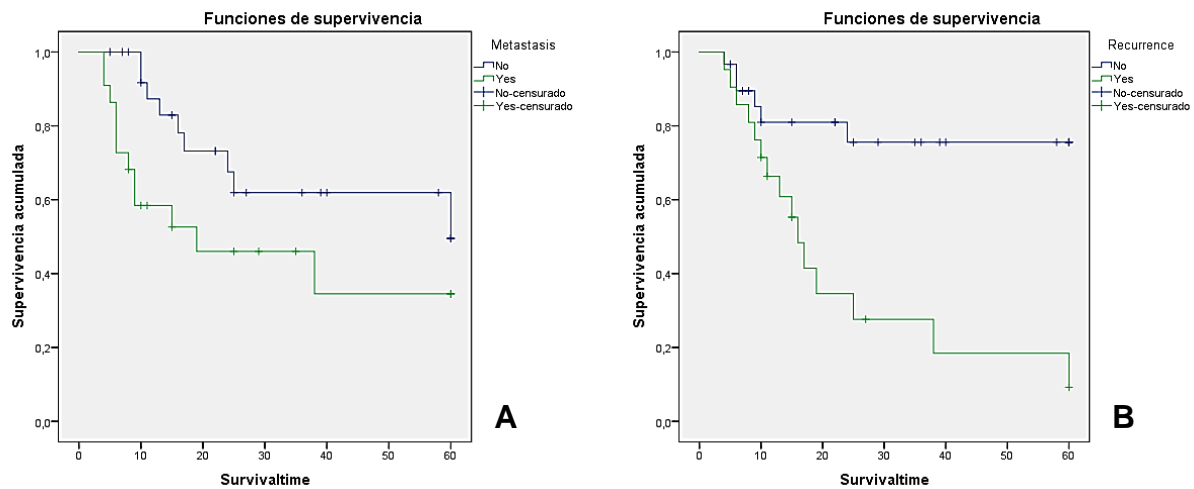


Imagen 8: Curvas de supervivencia específica de Kaplan-Meier de pacientes con carcinoma oral de células escamosas de 51 casos de este estudio. A) Curva de Kaplan-Meier mostrando una peor sobrevida específica de pacientes con COCE que presentaron metástasis linfonodal cervical (línea verde) comparado con los pacientes que no la presentaban (línea azul) ( $p = 0,05$ ). B) Curva de Kaplan-Meier mostrando una peor sobrevida específica de pacientes con COCE que recurrieron de la enfermedad (línea verde) comparado con los pacientes sin recurrencia (línea azul) ( $p = 0,01$ ).

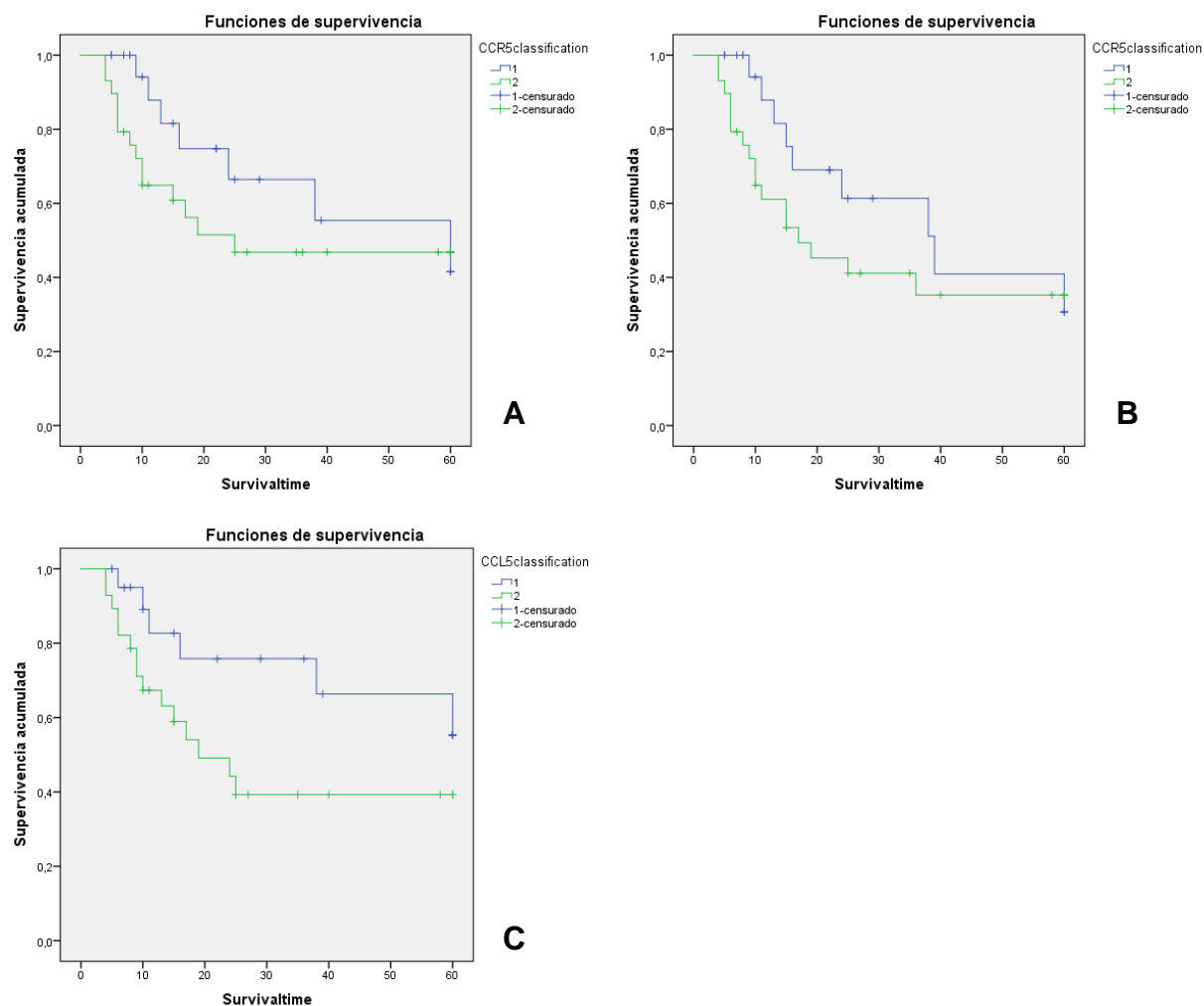


Imagen 9: Curvas de supervivencia específica de Kaplan-Meier de pacientes con carcinoma oral de células escamosas de 51 casos de este estudio. A) Curva de Kaplan-Meier mostrando una peor supervivencia específica de pacientes con COCE que presentaron altos niveles de CCR5 (línea verde) comparado con los pacientes con baja inmunoexpresión de CCR5 (línea azul) sin significancia estadística ( $p = 0,26$ ). B) Curva de Kaplan-Meier mostrando una peor supervivencia global de pacientes con COCE que presentaron altos niveles de CCR5 (línea verde) comparado con los pacientes con baja inmunoexpresión de CCR5 (línea azul) sin significancia estadística ( $p = 0,26$ ). C) Curva de Kaplan-Meier mostrando una peor supervivencia global de pacientes con COCE que presentaron altos niveles de CCL5 (línea verde) comparado con los pacientes con baja inmunoexpresión de CCL5 (línea azul) sin significancia estadística ( $p = 0,06$ ).

## 5. Discusión

A pesar de los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de diversos tipos de cáncer, para CCC la supervivencia global sigue siendo baja, lo cual se ha asociado a la agresividad del tumor y al diagnóstico tardío. El COCE se considera un cáncer agresivo, con una tasa de supervivencia global a 5 años de aproximadamente un 50%, que se reduce a menos del 30% en los estadios avanzados. La extensión del tumor, la metástasis en los ganglios linfáticos, las altas tasas de recidiva locorregional y el desarrollo de segundos tumores primarios son las principales causas de muerte en los pacientes con COCE (5).

El tratamiento y pronóstico de los CCC, incluyendo al COCE, se basa en la etapificación TNM, sin embargo, similares terapéuticas en pacientes con un mismo estadio TNM pueden tener diferentes evoluciones. Es así como en la estadificación no refleja apropiadamente el comportamiento biológico del cáncer, haciendo pensar que el TNM no es lo más adecuado para predecir el comportamiento del tumor ante una terapia determinada y que nuevos marcadores pronósticos agregados a la clasificación TNM son necesarios para los CCC.

Dentro de la 8va edición del sistema de estadiaje de la AJCC/UICC revisada el 2017 (30), se han introducido dos características histológicas, una en el parámetro del tamaño del tumor (T) y otra en el compromiso linfonodal (N), profundidad de invasión (DOI, Depth of invasion) y extensión extra nodal (ENE, extranodal extensión), respectivamente. Varias otras características histopatológicas, incluyendo invasión perineural (PNI, perineural invasion), invasión linfovascular, estado de los márgenes quirúrgicos, peor patrón de invasión (WPOI, worse patron of invasión), invasión ósea, grosor del tumor y la respuesta inflamatoria, como también las características descritas más recientemente, como el brote tumoral y la relación tumor-estroma, se han evaluado en variados estudios en relación con su impacto pronóstico o como indicadores de la necesidad de una estrategia de tratamiento multimodal en los COCE (31,32). Sin embargo, los estudios han utilizado diferentes métricas y parámetros de referencia, e incluso definiciones que pueden variar, generando resultados poco consistentes (33).

Muchos factores moleculares se han considerado como marcadores predictivos de metástasis en los ganglios linfáticos y de pobre supervivencia; sin embargo, los mecanismos asociados con la comunicación entre los ganglios linfáticos y las células metastásicas no se conocen del todo. Es posible que esta comunicación entre células malignas y las de los ganglios linfáticos esté dirigida por el eje de quimioquina y receptor de quimioquina, teniendo un papel fundamental en la atracción de las células neoplásicas a los sitios metastásicos.

Desde una perspectiva mundial, el uso del tabaco y el consumo de alcohol son los factores de riesgo más comunes, y el abuso combinado de ambas sustancias potencia el riesgo de desarrollar un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (4). De manera descriptiva observamos que, el hábito de fumar no representa una gran diferencia porcentual entre los casos con alta y baja expresión de CCR5, por el contrario, para el ligando observamos un 10% más de pacientes que fumaban y tenían una alta expresión de CCL5. En la variable consumo de alcohol, vemos que presentar este hábito tiende a una mayor expresión de CCR5 y CCL5. Con la recurrencia pasa algo similar, si bien los pacientes sin recurrencia de la enfermedad son menos que los que no lo hicieron, se observa un 9,7% más de recurrencia en los casos que tuvieron una alta expresión de CCR5 y un 21% más de recurrencia en los que tuvieron alta expresión de CCL5. Estos resultados descriptivos si bien no llegan a la significancia estadística, marcan tendencias que podrían dar base para estudiar dichas variables en otros estudios.

Con respecto al eje CCR5/CCL5 y su relación con la formación de focos metastásicos a distancia, Karnoub y cols. observaron que el CCL5 secretado por las células madre mesenquimáticas (CMM) promueve la metástasis del cáncer de mama mediante la unión con su receptor CCR5 (34). También se descubrió que la osteopontina, derivada del tumor, induce la producción de CCL5 por parte de las CMM. En cabeza y cuello se ha estudiado el rol del eje CCR5/CCL5 para invasión perineural en carcinoma adenoide quístico (CAQ). Tao Gao y cols. en 2018, determinaron mediante IHQ en 86 muestras de CAQ que la expresión de CCR5 fue significativamente mayor en las muestras que presentaban IPN comparándolas con las que no, a diferencia de lo que pasaba con la expresión de CCL5 donde no había una diferencia significativa (35). Con respecto a la

expresión de este eje receptor-ligando en COCE y su mayor probabilidad de presentar metástasis se ha visto que la interacción de CCL5 y CCR5 actúa a través de MEK y ERK, que a su vez activa NF- $\kappa$ B, lo que resulta en la activación de la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 y contribuye a la migración de las células de osteosarcoma humano (36). A pesar de lo anterior, son escasos los estudios que relacionen específicamente la expresión de CCR5/CCL5 en COCE con la IPN y con metástasis. González-Arriagada y cols. reportaron que la alta expresión de CCR5 en carcinomas escamosos de cabeza y cuello se asociaron con tumores poco diferenciados ( $P = 0,05$ ), metástasis en los ganglios linfáticos cervicales ( $P = 0,03$ ), estadio clínico avanzado ( $P = 0,03$ ) y recurrencia de la enfermedad ( $P = 0,01$ ) (5). Nuestro trabajo evidencia que los pacientes con COCE con una alta expresión de CCR5 tienen una mayor probabilidad de presentar IPN y también de desarrollar metástasis linfonodal cervical.

Se demostró que CCL5 promueve la invasión tumoral in vitro e in vivo en numerosos tipos de cáncer. En los cánceres de mama, la expresión elevada de CCL5 se asoció en gran medida con el estado avanzado y la progresión de la enfermedad (37). La expresión de CCL5 en muestras tumorales de adenocarcinoma de pulmón se correlacionó con una baja en la supervivencia (38). La sobreexpresión de CCL5 en células de cáncer de mama aumentó la migración e invasión del tumor in vitro y promovió la metástasis pulmonar en modelos animales experimentales (34). Los niveles más altos de CCL5 en las células de melanoma se correlacionaron con una mayor carga tumoral tras la inyección subcutánea en ratones (39). Además, el ciclo autocrino de CCL5 fue funcional en el linfoma de Hodgkin, el cáncer de próstata y el cáncer de ovario, actuando como un factor pro-metastásico. En cuanto a la Inmunoexpresión de CCL5, nuestro trabajo muestra altos niveles de ligando en pacientes con COCE en estadios clínicos más avanzados (III/IV), así como con pacientes que fallecieron. Finalmente, también se observó una asociación con la presencia de IPN.

En el análisis de las curvas de sobrevida solo tuvimos significancia estadística en la recurrencia de la enfermedad y alta expresión de CCL5 para supervivencia global, y la metástasis linfonodal cervical y recurrencia para supervivencia específica. Melese y cols. mostraron que la alta expresión de CCL5 se correlaciona con un pobre pronóstico, con

células T reguladoras inmunosupresoras y con la alteración de la función efectora de los CD8 en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (40). Es interesante mencionar que algunas variables se acercaron a la significancia estadística. Para la supervivencia global, 14 de 22 pacientes con metástasis linfonodal cervical fallecieron ( $p = 0,55$ ). Para la sobrevida específica, 16 de 33 pacientes en estadios III/IV fallecieron durante el seguimiento a los 5 años ( $p = 0,18$ ). Para la intensidad de expresión de CCL5 se observó que 15 de 28 pacientes que presentaron alta expresión del ligando fallecieron ( $p = 0.6$ ).

Tiene sentido que los pacientes de este estudio que presentaron recurrencia o compromiso linfonodal cervical disminuyan su tasa de sobrevida a los 5 años como ya es reportado en la literatura. Es interesante que los altos niveles de inmunoexpresión de CCL5 estén asociados a una mayor probabilidad de fallecer y que esta asociación no se observe con el CCR5 entendiendo que son parte de un eje receptor-ligando de alta afinidad. Podríamos pensar, que CCL5 al ser promiscuo y tener afinidad por otros receptores, al interactuar específicamente con CCR5 no tendría gran implicancia en la sobrevida de los pacientes con COCE a diferencia de lo que pasa en otros tipos de cánceres, como pulmón o hígado (41,42). Distinto es la asociación de la expresión de CCR5 en COCE con la metástasis linfonodal cervical y la IPN. Es así como es probable que el eje CCR5/CCL5 tenga una implicancia en etapas más avanzadas en el COCE y que a medida que avanza la enfermedad los altos niveles de CCL5 se vean involucrados con otros receptores que influyan en la probabilidad de muerte del paciente.

## **5.1. Comentarios**

Hasta la fecha no hay reportes documentados que intenten relacionar COCE y su inmunoexpresión del eje CCR5/CCL5 con metástasis linfonodal cervical, por lo que con trabajos como este se da pie para futuras investigaciones con cohortes más grandes o trabajos multicéntricos, y con ello darle una mayor relevancia al estudio inmunohistoquímico de esta neoplasia maligna y sumarlo a los parámetros asociados a pronóstico que existen actualmente.

## **5.2. Limitaciones del estudio**

1. El número de pacientes estudiados en este trabajo es bajo para asegurar representatividad de la expresión del eje CCR5/CCL5 en pacientes con COCE.
2. La evaluación de las muestras de inmunohistoquímica al ser realizadas por los investigadores tiene un porcentaje de subjetividad observador-dependiente.

## **6. Conclusiones**

1. La alta expresión de CCR5 tiene una relación con la metástasis linfonodal cervical y la IPN.
2. La alta expresión de CCL5 se relaciona con un peor estadio clínico, IPN y pobre sobrevida.
3. El eje CCR5/CCL5 podría ser útil como un marcador de pronóstico para el compromiso linfonodal regional sin embargo, deben realizarse nuevos estudios para validar su papel predictivo.

## 8. Resumen

**Introducción:** Los cánceres de cabeza y cuello (CCC) alcanzaron aproximadamente 890.000 nuevos casos y 450.000 muertes en el mundo en 2018, representando el séptimo cáncer más frecuente. El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el subtipo más común de los CCC. El eje CCR5/CCL5 juega un papel en la metástasis de diferentes tipos de cáncer. El COCE tiene limitados estudios con dicho eje en metástasis linfonodal, entonces nos preguntamos: ¿Existe una expresión inmunohistoquímica diferente de los marcadores asociados al eje CCR5/CCL5 en COCE de pacientes con metástasis en ganglios cervicales comparado con pacientes sin metástasis?. **Objetivo:** Comparar los niveles de inmunoexpresión de CCR5 y CCL5 en muestras de COCE de pacientes con y sin metástasis linfonodal. **Metodología:** Se evaluaron mediante inmunohistoquímica con CCR5 y CCL5 biopsias de 54 pacientes con COCE tratados en el Hospital Carlos van Buren, de los cuales 25 presentaban metástasis linfonodal y 29 no. Las muestras se clasificaron mediante un sistema de puntuación previamente publicado como de baja expresión y de alta expresión. **Resultados:** Alta inmunoexpresión de CCR5 fue correlacionada con metástasis linfonodal cervical ( $p = 0,020$ ) e invasión perineural (IPN) ( $p = 0,011$ ). Altos niveles de CCL5 fueron asociados con un mayor estadio clínico ( $p = 0,025$ ), presentar IPN ( $p = 0,037$ ) y con la muerte del paciente ( $p = 0,037$ ). **Conclusiones:** para esta cohorte de pacientes con COCE, la alta expresión de CCR5 tiene una relación con la metástasis linfonodal cervical y la IPN, como la alta expresión de CCL5 la tiene con un peor estadio clínico, IPN y mayor probabilidad de fallecer.

## 9. Bibliografía

1. Borcoman, Edith;Marret, Gregoire;Le Tourneau C. Paradigm change in first-line treatment of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Basis Cancer*. 2018;2573.
2. The Global Cancer Observatory. Chile Source: Globocan 2020 Factsheet [Internet]. Vol. 157, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. p. 1–2.
3. Sarode G, Maniyar N, Sarode SC, Jafer M, Patil S, Awan KH. Epidemiologic aspects of oral cancer. *Disease-a-Month*. 2020;66(12):100988.
4. Magnes T, Wagner S, Kiem D, Weiss L, Rinnerthaler G, Greil R, et al. Prognostic and predictive factors in advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
5. González-Arriagada WA, Lozano-Burgos C, Zúñiga-Moreta R, González-Díaz P, Coletta RD. Clinicopathological significance of chemokine receptor (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4) expression in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(8):755–63.
6. Domingueti CB, Janini JBM, Paranaíba LMR, Lozano-Burgos C, Olivero P, González-Arriagada WA. Prognostic value of immunoexpression of ccr4, ccr5, ccr7 and cxcr4 in squamous cell carcinoma of tongue and floor of the mouth. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2019;24(3):e354–63.
7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
8. Warnakulasuriya S, Greenspan JS. *Textbook of Oral Cancer Prevention, Dignosis ans Manegement*. 1st ed. Suiza: Springer Nature; 2020. 1–22 p.
9. Conway DI, Purkayastha M, Chestnutt IG. The changing epidemiology of oral cancer: Definitions, trends, and risk factors. *Br Dent J*. 2018;225(9):867.
10. Aldinucci D, Colombatti A. *The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression*. 2014;2014.
11. Ralli M, Grasso M, Gilardi A, Ceccanti M, Messina MP, Tirassa P, et al. The role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma: A review. *Clin Ter*. 2020;171(3):E1–7.
12. Liang Y, Feng G, Zhong S, Gao X, Tong Y, Cui W, et al. An Inflammation-Immunity classifier of 11 chemokines for prediction of overall survival in head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit*. 2019;25:4485–94.
13. Aldinucci D, Casagrande N. Inhibition of the CCL5 / CCR5 Axis against the

Progression of Gastric Cancer. 2018;

14. Weng CJ, Chien MH, Lin CW, Chung T Te, Zavras AI, Tsai CM, et al. Effect of CC chemokine ligand 5 and CC chemokine receptor 5 genes polymorphisms on the risk and clinicopathological development of oral cancer. *Oral Oncol* [Internet]. 2010;46(10):767–72.
15. Niklander SE, Murdoch C, Hunter KD. IL-1/IL-1R Signaling in Head and Neck Cancer. *Front Oral Heal*. 2021;2(August):1–14.
16. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med*. 2000;248(3):171–83.
17. Charo IF, Ransohoff RM. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354(6):610–21.
18. Maghazachi AA. Role of Chemokines in the Biology of Natural Killer Cells. (April 2010):37–58.
19. Chuang J, Yang W, Chen H, Huang C, Tan T, Lin Y, et al. CCL5 / CCR5 Axis Promotes the Motility of Human Oral Cancer Cells. 2009;(91):418–26.
20. Aldinucci, D.; Borghese, C.; Casagrande N. The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1765.
21. Kulmann-Leal B, Ellwanger JH, Chies JAB. A functional interaction between the CCR5 and CD34 molecules expressed in hematopoietic cells can support (or even promote) the development of cancer. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2020;42(1):70–6.
22. Xolalpa W, Pestell RG, Velasco-vela M. The potential to target CCL5 / CCR5 in breast cancer. 2014;1–11.
23. Izumi K. Suppressive Role of Androgen / Androgen Receptor Signaling via Chemokines on Prostate Cancer Cells. 2019;
24. Huang R, Guo L, Gao M, Li J, Xiang S. Research Trends and Regulation of CCL5 in Prostate Cancer. 2021;1417–27.
25. Kranjc MK, Novak M, Pestell RG, Lah TT. Cytokine CCL5 and receptor CCR5 axis in glioblastoma multiforme Tumour microenvironment. 2019;
26. Vered M, Shnaiderman-Shapiro A, Schiby G, Zlotogorski-Hurvitz A, Salo T, Yahalom R. Markers of the pre-metastatic niche “knock on the door” of metastasis-free cervical lymph nodes in patients with oral cancer. *Acta Histochem*. 2019;121(8):151447.
27. Wang H, Pan J, Barsky L, Jacob JC, Zheng Y, Gao C, et al. Characteristics of pre-metastatic niche: the landscape of molecular and cellular pathways. *Mol Biomed*. 2021;2(1).
28. Roh SKJ, Park C. Immunohistochemistry for Pathologists : Protocols , Pitfalls , and

Tips. 2016;411–8.

29. Ramos A. Chapter 5 Principles and Methods of Immunohistochemistry. 691:83–96.
30. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):122–37.
31. Tirelli G, de Groodt J, Sia E, Belgrano MG, Degrassi F, Boscolo-Rizzo P, et al. Accuracy of the Anatomage Table in detecting extranodal extension in head and neck cancer: a pilot study. *J Med Imaging.* 2021;8(01):1–13.
32. Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol.* 2020;107(May):104799.
33. Dolens E da S, Dourado MR, Almangush A, Salo TA, Gurgel Rocha CA, da Silva SD, et al. The Impact of Histopathological Features on the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2021;11(November):1–13.
34. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449(7162):557–63.
35. Gao T, Shen Z, Ma C, Li Y, Kang X, Sun M. The CCL5/CCR5 Chemotactic Pathway Promotes Perineural Invasion in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;76(8):1708–18.
36. Wang SW, Wu HH, Liu SC, Wang PC, Ou WC, Chou WY, et al. CCL5 and CCR5 interaction promotes cell motility in human osteosarcoma. *PLoS One.* 2012;7(4).
37. Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, et al. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59(18):4681–7.
38. Borczuk AC, Papanikolaou N, Toonkel RL, Sole M, Gorenstein LA, Ginsburg ME, et al. Lung adenocarcinoma invasion in TGF $\beta$ RII-deficient cells is mediated by CCL5/RANTES. *Oncogene.* 2008;27(4):557–64.
39. Mrowietz U, Schwenk U, Maune S, Bartels J, Küpper M, Fichtner I, et al. The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumour formation in nude mice. *Br J Cancer.* 1999;79(7–8):1025–31.
40. Melese ES, Franks E, Cederberg RA, Harbourne BT, Shi R, Wadsworth BJ, et al. CCL5 production in lung cancer cells leads to an altered immune microenvironment and promotes tumor development. *Oncoimmunology.* 2022;11(1).

41. Tang Y, Hu Y, Niu Y, Sun L, Guo L. CCL5 as a Prognostic Marker for Survival and an Indicator for Immune Checkpoint Therapies in Small Cell Lung Cancer. *Front Med.* 2022;9(February):1–13.
42. Wang C, Shi J, Xu J, Fu Q, Ding Y, Yang J, et al. NLRC3 High Expression Represents a Novel Predictor for Positive Overall Survival Correlated With CCL5 and CXCL9 in HCC Patients. *Front Oncol.* 2022;12(January):1–11.